

Title	Synthetic RNA-based logic computation in mammalian cells(Abstract_要旨)
Author(s)	Matsuura, Satoshi
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2019-03-25
URL	https://doi.org/10.14989/doctor.k21694
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士（医科学）	氏 名	松浦 理史
論文題目	Synthetic RNA-based logic computation in mammalian cells （哺乳類細胞における人工 RNA を基盤とした論理計算）		
（論文内容の要旨）			
<p>合成生物学の分野において、細胞種を特徴づける細胞内情報分子を検知する人工遺伝子回路を用いて細胞運命を制御するという研究がなされてきた。このような技術は特定の細胞種のソーティング技術やがん細胞の除去などへの医療応用が期待される。中でも有力な細胞内情報分子として、マイクロ RNA (miRNA)が挙げられる。実際、miRNA 応答性の遺伝子回路を用いて細胞の種類や状態を識別できることが報告されてきていた。しかしながら、これまでの研究ではもっぱらプラスミド DNA を基盤とした遺伝子回路が開発されてきた。これは例えば多能性幹細胞から分化誘導した細胞から特定の細胞種のみを純化するという再生医療応用を考えた際に、DNA から構成された回路自体が導入細胞のゲノムへ取り込まれる可能性があることから安全上の点で問題がある。そこで近年、DNA と比べてゲノムへの挿入リスクが低い RNA や RNA と結合するタンパク質を利用した転写後制御を基盤とする遺伝子回路が開発された。しかしながら、回路の検出感度（回路の On 状態、Off 状態における出力遺伝子の発現比率）が低いこと、標的細胞特異的な miRNA を 1 種類しか検出できないこと（特異性の問題）、という実用上 2 つの問題があった。更なる人工 RNA を基盤とする遺伝子回路の発展のためには、より高い検出感度を持ち、かつ複数の miRNA を同時検出できる多入力応答性の遺伝子回路の開発が必要である。</p> <p>本論文では、従来よりも検出感度が改善され、複数種類の miRNA の同時検出も可能とする論理回路について報告する。まず、第一の問題である回路の検出感度の改善に向けて、入力分子となる miRNA に対する検出感度の改善に着目した。既存の回路では miRNA の標的配列は回路を構成する人工 mRNA の 3'非翻訳領域 (3' UTR)にのみ挿入されていた。そこで 5' UTR にも挿入することで感度が改善し得るかどうかを外在導入の miRNA を用いた蛍光アッセイにより検証した。その結果、既存の回路と比べて大きく検出感度を改善することに成功した。重要なことに、回路の On 状態、Off 状態それぞれにおける細胞集団をセルソーター上で識別することが可能となった。また、改善した回路が内在性の miRNA も検出できることも実証された。次に多入力応答性回路の構築に向けて 2 種類の入力 miRNA の同時検出を可能とする論理回路の構築を試みた。上述の改善した回路を元に、まず始めに最も基本的な論理回路である AND 回路と OR 回路の構築に成功した。次に、より複雑な発現制御を要する NAND 回路, NOR 回路,XOR 回路の構築を試みた。これは回路を構成する RNA 結合タンパク質が結合する RNA 配列（アプタマー）の 2 次構造を安定化することで、これらの回路の構築にも成功した。最後に、論理回路を用いた細胞死の制御を検討した。そこで細胞死促進遺伝子を出力に持つ 2 入力 AND 回路を構築し、細胞に導入した。その結果、2 種類の入力 miRNA が存在するときのみ細胞死が誘導された。</p> <p>このような人工 RNA を基盤とした論理回路は、より精密でかつ安全な細胞運命制御システムとして医療応用分野において貢献することが期待される。</p>			

<p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>DNA から構成される人工遺伝子回路は回路自体が意図せず導入細胞のゲノムへ取り込まれる可能性があり、再生医療用の細胞の選別などへの医学応用を考えた際、安全上の点で問題となりうる。そこで人工 RNA から構成されるマイクロ RNA (miRNA) 応答性遺伝子回路が開発されたが、既存の回路には出力の On/Off 比（回路の On 状態、Off 状態における出力遺伝子の発現比率）が低いこと、標的細胞特異的な miRNA を 1 種類しか検出できないこと（特異性の問題）、という 2 つの問題があった。本研究では、回路の miRNA 標的配列の配置を検討することで、入力 miRNA に対する感度を高めて回路の On/Off 比を改善できることを外在性、及び内在性 miRNA を用いた実験系で実証した。次に、回路を構成するタンパク質応答スイッチのアプタマー周辺配列を改変することで、2 入力応答性の基本論理回路を全種類、構築できることも実証した。さらに、2 入力応答性アポトーシス制御性 AND 回路を用いて、2 種類の miRNA の活性パターンに基づき細胞死を制御することにも成功した。これらの成果から、本研究は DNA と比べて安全性の高い人工 RNA を用いた、より精密な細胞運命制御システムを実現したと言える。</p> <p>以上の研究は人工 RNA から構成されるマイクロ RNA 応答性の遺伝子回路を用いた細胞の選別や運命制御を行う手法を確立したものであり、合成生物学やバイオテクノロジーの発展に寄与するところが多いと考えられる。また、将来に再生医療など医学分野への貢献が期待される。</p> <p>したがって、本論文は博士（ 医科学 ）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 31 年 2 月 12 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			